

Tetrazoliumvegyületek fényreakciói

II. A formazánok foto-oxidációja

JÁMBOR BÉLA

Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényélettani Intézet, Budapest

Előző közleményünkben a TTC és egyes származékainak fény hatására bekövetkező diszproporcionálódási reakcióját tettük beható vizsgálat tárgyává [8]. Ennek során láttuk, hogy a diszproporcionálódással keletkező formazán ismét TTC-vé oxidálódik fény hatására s ez a két reakció tanulmányozását nagymértékben megnehezíti. Hogy a múlt közleményünkben felmerült több kérdést tisztázzunk, feladatunknak tekintettük a formazánok foto-oxidációjának tanulmányozását is. A kérdés fontosságát — az elméleti érdekesség mellett — az is fokozta, hogy többek megfigyelése szerint a szövetmetsetben a redukció folytán keletkezett trifenilformazán elhalványodik fény hatására [6]. Ennek magyarázatát kétféleképpen kísérelhetjük meg: egyrészt a formazán foto-oxidációjával, másrészt azzal, hogy szintelen termékévé redukálódik tovább. A formazán oxidációját részletesen tanulmányozta H a u s s e r [3]. Azonban sem ő, sem a kérdéssel futólag foglalkozó K u h n és munkatársai [4] nem tértek ki a formazán foto-oxidációjának mechanizmusára.

Kísérleti rész

A vizsgálati módszerek, anyagok és készülékek azonosak voltak az előző közleményünkben [8] leírtakkal.

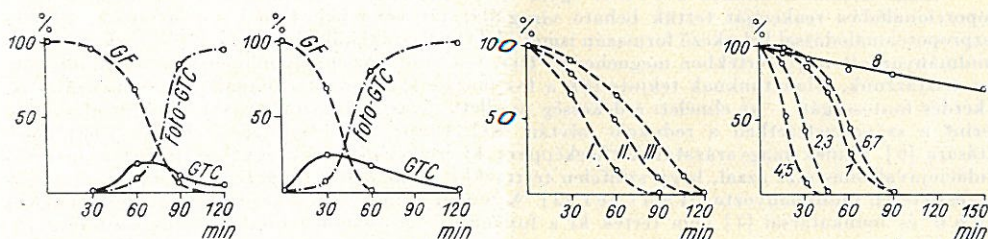
A végzett kísérletek

Feladatként annak tisztázását tűztük magunk elé, hogy a formazánok elszíntelenedési reakciójának milyen a mechanizmusa, a kinetikai lefolyása és hogyan hatnak rá egyes kísérleti feltételek. Mivel az elszíntelenedési reakcióval párhuzamosan a reakció termékeként keletkező TTC diszproporcionálódási reakciója is lejátszódik, az előbbi reakciót „tisztán” tanulmányozni nem tudjuk, csak a két reakció eredőjét. Nem tudjuk ui. a diszproporcionálódási reakciót megakadályozni, „blokkolni” és így a következőkben ismertetett kísérleti eredményeinkből csak inkább minőségi jellegű következtetéseket vonhatunk a reakció mechanizmusára.

1. A később ismertetendő kísérleteink arra mutattak, hogy aerob viszonyok között a formazán elszíntelenedése, ill. foto-oxidációja oxigén és víz részvételével történik. Mivel a TF csak 70–100%-os alkoholban oldódik, tiszta vízben nem, ezért az elszíntelenedés lefolyását először a galaktoformazán esetében vizsgáltuk, mivel az tiszta vízben is oldódik a szükséges töménységben. Vizsgálataink egyébként azt mutatták, hogy a galakto-származékok a TTC-hez hasonlóan viselkednek a fényreakciót illetően, legfeljebb a reakciósebességek eltérők.

Először azt a kérdést vizsgáljuk meg, hogy a GF vízoldatát megvilágítva milyen lefutású az időgörbéje a GF eltűnésének, ill. a GTC és foto-GTC képződésének. A fotometrálással és polarográfiával kapott eredményeket az 1. ábra mutatja. Ezen látható, hogy az GF elszíntelenedése nem a szokásos exponenciális görbét, hanem S-alakú görbét ír le. Ilyen S-alakú görbéje az autokatalitikus reakcióknak van [9]. Ez maga után vonja természetesen, hogy a belőle keletkező termékek időgörbéje is ennek megfelelő lefutású.

2. Felmerült tehát az a kérdés, hogy mely reakciótermék katalizálja a formazán elszíntelenedését. Szóbajöhető reakciótermékek: a GTC, foto-GTC és — mint később látni fogjuk — a hidrogénperoxid. Vizsgálataink azt mutatták, hogy a H_2O_2 nem gyorsítja észrevehetően az elszíntelenedést. Hogy a GTC, és foto-GTC fejt-e ki katalitikus hatást, arra nézve az volt az elképzelésünk, hogy a katalitikusan hatékony helye a molekulának nyilván a tetrazolium-gyűrű s nem a rajta levő fenil-csoportok, ill. a galaktóz. Ezért nemcsak a GTC-nek, ill. foto-GTC-nek, hanem a TTC-nek, illetve foto-TTC-nek is katalizálnia kell a GF elszíntelenedését. A GF vizes oldatához ezért tizedannyi foto-TTC-t adva megismé-



1. ábra

2. ábra

3. ábra

4. ábra

1. ábra. 10^{-4}M GF vizes oldatában, levegő jelenlétében, szórt napfényen különböző ideig való állás után talált reakciótermékek mennyisége az eredeti GF mennyiség %-ában. 2. ábra. 10^{-4}M GF reakciója az 1. ábrával azonos kísérleti feltételek mellett, de 10^{-5}M foto-TTC jelenlétében. 3. ábra. 10^{-4}M GF vízoldatának elszíntelenedése 10^{-5}M B₂-vitamin (I) foto-TTC (II) jelenlétében és anélkül (III) szórt napfényen levegő jelenlétében. 4. ábra. 10^{-4}M TF elszíntelenedése közvetlen napfényen, levegő jelenlétében 70%-os alkoholos oldatban, 10^{-5}M töménységű, különböző fluoreszkáló anyagok hatására. 1: Fluoreszkáló anyag hozzáadása nélkül. 2-3: Fluorescein, foto TTC. 4-5: B₂-vitamin Rhodamin B. 6-7: Berberinszulfát, Auramin. 8: Fluoreszkáló anyag helyett kb. 5 mg/ml KCl-t tartalmazó TF-oldat.

teltük az 1. ábrán közölt kísérletet (helyesebben azzal együtt, párhuzamosan végeztük). A 2. ábrán látható, hogy a foto-TTC hozzáadása tényleg gyorsítja a GF elszíntelenedését. Az elszíntelenedés felezési ideje foto-TTC hozzáadása nélkül kb. 70 perc, annak jelenlétében pedig kb. 35 perc volt. Mindkét esetben akkor kezd el a GF nagyobb mértékben színtelenedni, mikor már mérhető mennyiségű foto-GTC, ill. foto-TTC van jelen. A szükséges fototermék képződése az előző kísérlet során mintegy $\frac{1}{2}$ órát vett igénybe, mesterségesen hozzátéve azonnal megindul az észrevehető elszíntelenedés.

Fentiek értelmében a TTC is gyorsítja az elszíntelenedést mivel abból a diszproporcionálódási reakció során gyorsabban keletkezik a katalizáló foto-termék, mint formazánból. Az utóbbiból ui. a fototermék csak két lépésben képződhet: először fotooxidációnak kell történnie s ennek termékéből keletkezik csak diszproporcionálódással a katalizáló fototermék. A TTC hozzáadásával készült s itt nem közölt elszíntelenedési görbe az 1. és 2. ábra megfelelő görbéi között átmenetet képez: az S-görbe lehajlása kb. $\frac{1}{4}$ órás megvilágítással következik be.

3. Felmerülhet az a kérdés is, mi a katalizáló hatás oka: kémiai-e vagy más természetű. E kérdés vizsgálatát összekapcsoltuk Atkinson és munkatársai [1] azon észleletével, hogy a TTC 1%-os vizes oldatában B₂-vitamin jelenlétében

nem észlelhető fény hatására TF kiválás. Arra gondoltunk, hogy esetleg a B_2 -vitamin a TF fotooxidációját katalizálja s ezért nem tud kiválni a TF. A 3. ábrában közölt kísérlet során ezért arról kívántunk meggyőződni, hogy tényleg katalizálja-e a B_2 -vitamin a GF elszíntelenedését. Amint látható, a katalizáló hatás határozottan megállapítható.

Ez a kísérlet egyébként arra is alkalmat ad, hogy összehasonlítsuk a GF elszíntelenedésének lefutását az 1. és 3. ábrán. Látjuk, hogy ezek különböznek egymástól: az 1. ábrán az S-görbe hamarabb kezd lefelé hajlani, mint a 3. ábrán, ugyanekkor elnyúlabb annál, holott egyezniük kellene. Ez azzal magyarázható, hogy a két kísérlet között 1 év telt el s a később (3. ábra) használt GF már régi volt, feltehetőleg fény érte, vagy anélkül is oxidálódott kis mértékben GTC-vé, esetleg foto-GTC-vé s ez elég ahhoz, hogy az S-görbe felső vízszintes része megrövidüljön. A másik eltérés, az S-görbe elnyúlt voltát viszont az idézhette elő, hogy valamivel gyengébb volt a fény, mint az 1. ábra adatainak mérésekor. Ezért nem hasonlíthatók össze az 1. és 2. ábra adatai a 3.-éval; viszont az 1. és 2. ábra görbéi egymással valamint a 3. ábra 3 görbéje szintén egymással összehasonlítható, mert azonos feltételek mellett jöttek létre.

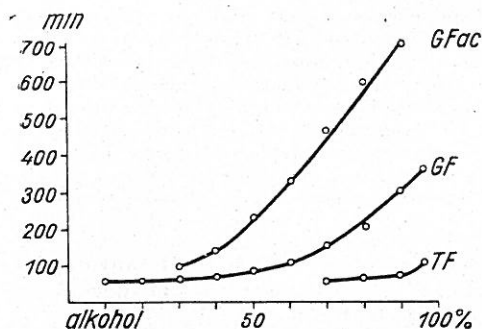
4. A B_2 -vitaminnak a formazán elszíntelenedésére gyakorolt katalitikus hatása felvetette azt a kérdést, hogy mi a közös sajátsága a foto-TTC-nek és B_2 -vitaminnak. Bár a nitrogén tekintetében van köztük némi kémiai rokonság is, sokkal valószínűbbnek látszott azonban a fluoreszkálóképességben keresni a katalizáló hatás okát. Mindkét említett anyag ui. fluoreszkál: a B_2 -vitamin zöldes-sárga, a foto-TTC pedig kékeszöld fluoreszcenciát mutat. [4].

A következő kísérletünkben ezért több fluoreszkáló anyagot vizsgáltunk meg arra nézve, hogy katalizálja-e a formazán elszíntelenedését. Ezt a kísérletünket már nem GF-fel, hanem TF 70%-os alkoholos oldatával végeztük. A 10^{-4} töménységű TF oldatok a katalizáló hatásra vizsgálandó anyagokat szintén tizedrésnyi, azaz 10^{-5} M koncentrációban tartalmazzák. Mivel alkoholban az elszíntelenedés igen lassú (erre még visszatérünk), szórt napfény helyett közvetlen napfénnel világítottuk meg az oldatokat. Mint látható, a 4. ábrán, a B_2 -vitamin és a rhodamin mutatkozott a leghatékonyabbnak; a fluoreszcein kb. a foto-TTC-vel azonos katalizáló hatást mutatott, míg a berberinszulfát és az auramin nem katalizálta az elszíntelenedést inkább kissé késleltette az adott kísérleti feltételek mellett.

5. Mint említettük, Atkinson és munkatársai [1] megfigyelték, hogy TTC vízoldatában a fény hatására történő formazánkiválás mértékét erősen fokozza az oldathoz adott kevés foszfát puffer ($p_H = kb. 7$). A szerzők úgy vélik, hogy ez a fényreakció p_H -érzékenységére vall. Ezzel kapcsolatban arra gondoltunk hogy a foszfát, mint elektrolit (tehát függetlenül a puffer jellegétől) is gyakorol hatást. Ez a hatás feltételezésünk szerint nem az elsődleges (diszproporcionálódási), hanem a másodlagosan bekövetkező fotooxidációra érvényesül, vagyis a keletkező TF oxidációját gátolja s főleg ennek következménye a fokozott formazánkiválás. Előző kísérletünket tehát kiegészítettük azzal, hogy fluoreszkáló anyag helyett káliumkloridot tartalmazó sorozatot is beállítottunk. A 4. ábra 8. görbéje azt mutatja, hogy KCl jelenléte a TF elszíntelenedését nagy mértékben gátolja. Ezzel bebizonyítottuk, hogy a semleges só jelenléte gátolja a TF fotooxidációját. A KCl elszíntelenedését gátló hatásának valószínű okát kutatva felmerült annak lehetősége, hogy a KCl esetleg az autokatalízist előidéző foto-TTC fluoreszkáló képességét csökkenti. Ellinger [2] ugyanis kimutatta, hogy sók jelenléte igen sok vegyület fluoreszcenciáját csökkenti. Ezért foto-TTC-hez különböző mennyiségű KCl-t adva, analitikai kvarclámpa alatt megnéztük, hogy az befolyásolja-e a fluoreszcenciát. Vizsgálatunk azzal az eredménnyel járt, hogy a KCl koncentrációt növelve lényegesen csökkent a foto-TTC fluoreszcenciája. Ez egyrészt valószínű-

síti fenti feltételezésünket, másrészt azt is, hogy a foto-TTC katalizáló hatása a fluoreszcenciával kapcsolatos.

6. Az 5. ábrán háromféle formazán (TF, GF, és GF-acetát) elszíntelenedési reakciójának felezési idejét közöljük az

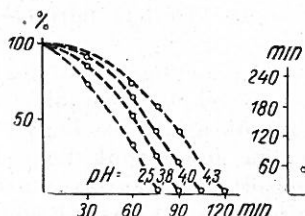


5. ábra

10^{-4} M TF, GF és GF-acetát elszíntelenedési felezési ideje, az oldat alkoholtartalmának függvényeként, napon, levegő jelenlétében

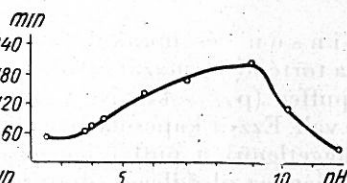
hozzáadása „katalizálja” a TF elszíntelenedését. A közeg pH értékét tágabb határok között változtatva az elszíntelenedés mértékét a 7. ábra mutatja. Ebből látható, hogy az oldat pH értékének növekedésével az elszíntelenedés kb. $pH = 9$ -ig egyre lassúbb; ennél lúgosabb közegben ismét növekszik.

8. Felmerült az a kérdés is, hogy az elszíntelenedés sebessége hogyan függ a formazán kezdeti koncentrációjától. A 8. ábra A görbéje azt mutatja, hogy az elszíntelenedett formazán abszolút mennyisége a kezdeti koncentrációtól csaknem



6. ábra

6. ábra. 10^{-4} M trifenilformazán elszíntelenedése napon, pufferrel különböző pH -értékre beállított 70%-os alkoholban, levegő jelenlétében 7. ábra. 10^{-4} M TF elszíntelenedésének felezési ideje, az oldat pH -értékének függvényeként



7. ábra

körülmények között a legkézenfekvőbb oxidáló anyag a levegő oxigénje. Igen sok auto-oxidáció során az oxidálódó anyagról leszakadó hidrogén és a levegő oxigénje hidrogénperoxiddá reagál egymással. Ezt tapasztaltuk például a C-vitamin auto-oxidációjánál is, nem publikált kísérleteinkben. Feltételezhető volt tehát, hogy a formazánok fotooksidációja során is H_2O_2 keletkezik. Ezt megerősítette az, hogy a fotokémiai reakciók tanulmányozása során készített polarogramokban a H_2O_2 -re jellemző lépcsőt találtunk, melynek magassága látszólag korrelációban volt az átalakult formazán mennyiségével. Hogy ez a

oldószer (víz + alkohol) alkoholtartalmának függvényeként. Látjuk egyrészt, hogy a háromféle formazán elszíntelenedése igen különböző sebességgel játszódik le: leggyorsabban a TF-é, kb. háromszorta lassabban a GF-é s a leglassabban a GF-acetáté. Érdekes, hogy a fotoaktív gyűrű szubsztituense milyen meglepően nagy befolyást gyakorol. Megállapítható az is, hogy az oldószer víztartalmának csökkenésével erősen nő az elszíntelenedés felezési ideje.

7. A 6. ábrán 10^{-4} M TF elszíntelenedési görbéjének lefutása látható, különböző pH értékre beállított 70%-os alkoholban, aerob körülmények között. Eredményünk jól egyezik Haussner [3] azon megállapításával, hogy sósav

[3] azon megállapításával, hogy sósav a közeg pH értékét tágabb határok között változtatva az elszíntelenedés mértékét a 7. ábra mutatja. Ebből látható, hogy az oldat pH értékének növekedésével az elszíntelenedés kb. $pH = 9$ -ig egyre lassúbb; ennél lúgosabb közegben ismét növekszik.

8. Felmerült az a kérdés is, hogy az elszíntelenedés sebessége hogyan függ a formazán kezdeti koncentrációjától. A 8. ábra A görbéje azt mutatja, hogy az elszíntelenedett formazán abszolút mennyisége a kezdeti koncentrációtól csaknem független: annak háromszoros növelésével az átalakult formazán abszolút mennyisége 24%-kal csökkent.

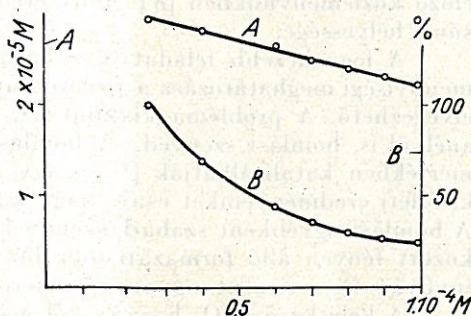
9. Minthogy a formazánok elszíntelenedése aerob körülmények között TTC származékot eredményez, világos, hogy fotooksidációval van dolgunk. Ez csak megfelelő proton-, illetőleg elektron-akceptor jelenlétében, annak egyidejű redukciója kapcsán lehetséges. Aerob

hidrogénperoxidnak tulajdonított lépcső tényleg attól származik, arról úgy győződünk meg, hogy egy ilyen lépcsőt adó oldatot egy csepp vér hozzáadása után újra polarografáltunk. Miután a vér kataláz-tartalma néhány perc alatt elbontja a H_2O_2 -ot, a lépcsőnek el kell tűnnie, ha az tényleg hidrogénperoxidtól ered. Amint a 9. ábra mutatja, a kérdéses lépcső tényleg eltűnt vér hatására. További megerősítést nyert a H_2O_2 keletkezésére nézve tett megállapításunk az azal is, hogy a fényreakciót szenvedett formazánoldatban kémiai módszerrel is kimutattuk a H_2O_2 -ot. A 9. ábrán minőségi és mennyiségi összehasonlítás céljából levegővel érintkező $n/100$ KCl-oldat polarogrammját is közöljük. Mint ismeretes [10], levegővel érintkező híg vizes elektrolit-oldatok szobahőfokon kb. 8 mg oxigént tartalmaznak literenként. Ismeretes továbbá az is [5], hogy az oldott oxigén két polarográfiai lépcsőt ad: az első a H_2O_2 -á való redukciót jelzi, a második (kb. -1 V-nál) pedig a keletkezett H_2O_2 vízzé való redukciójával kapcsolatos. A 9. ábra 1. görbéjének II. lépcsője tehát $2,5 \cdot 10^{-4}$ M H_2O_2 -nek felel meg, amint az könnyen kiszámítható.

A H_2O_2 keletkezésének felismerése három kérdés felvetését vonta maga után: 1. Tényleg a levegő oxigénjéből származik-e? 2. Keletkezése a formazán elszíntelenedésével kapcsolatos-e, s nem esetleg vele szimultán lejátszódó diszproporcionálódással-e, vagy esetleg a víz fotolízise révén elképzelhető-e a keletkezése? 3. Ha tényleg a formazán foto-oxidációjával kapcsolatos a H_2O_2 keletkezése, akkor 1 mol formazán elszíntelenedése hány mol H_2O_2 keletkezését vonja maga után?

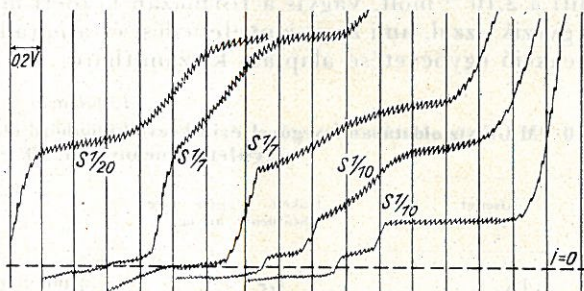
Az első kérdésre úgy nyertünk választ, hogy formazánt anaerob körülmények között tettünk ki fény hatásának. A kísérlet eredménye azt mutatta, hogy egyrészt nem keletkezik ilyen körülmények között H_2O_2 másrészt az is kiderült, hogy így csak igen lassan színtelenedik el a formazán.

A második kérdésre nézve azt a kísérletet végeztük, hogy párhuzamosan végeztünk fényreakciót azonos körülmények között formazánból és a hozzátartozó TTC-származékból kiindulva.



8. ábra

Különböző koncentrációjú vizes GF-oldatban, 6 órai szórt napfény hatására átalakult GF mennyisége. A: abszolút értékben. B: a kezdeti GF-koncentráció %-ában



9. ábra

Hidrogénperoxid képződése. A polarogramok balról jobbra: 1: 10^{-2} M KCl, levegő jelenlétében felvéve (a második lépcső kb. $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol H_2O_2 -nek felel meg). 2: 10^{-4} M GF 2 óráig fényen való állás után. 3: 10^{-4} M GTC 2 óráig fényen való állás után. 4: 10^{-4} M GF 1 óráig fényen való állás után. Az első lépcső a GF + GTC, a 2. a foto-GTC, a 3. a H_2O_2 lépcsője. 5: Ugyanaz 1 csepp vér hozzáadása után felvéve

Amint majd látni fogjuk, formazánból kiindulva kétszerannyi H_2O_2 keletkezése várható, mint a megfelelő TTC származékból, ha tényleg a formazán elszíntelenedésével kapcsolatos a H_2O_2 keletkezése. Többször ismételt kísérleteink szerint formazánból kiindulva tényleg kétszeres mennyiségű H_2O_2 keletkezik (9. ábra). Ezt összevetve a diszproporcionálódási reakcióval kapcsolatos, előző közleményünkben [8] leírt eredményeinkkel, behizonyosodott feltételezésünk helyessége.

A legnehezebb feladatot a harmadik kérdés tisztázása jelentette. A H_2O_2 mennyiségi meghatározása a polarogramok alapján igen kényelmesen és pontosan elvégezhető. A probléma viszont az, hogy a keletkező H_2O_2 fény hatására, sőt anélkül is, bomlást szenved. A bomlás sebességét ellenőrizhetetlen tényezők nagy mértékben katalizálhatják [9] s így a keletkező H_2O_2 mennyiségére vonatkozó kísérleti eredményeinket csak nagy körültekintéssel és fenntartással fogadhatjuk. A bomlást egyébként szabad szemmel is megfigyelhettük: az aerob körülmények között fényen álló formazán-oldatból a kémcső falára kis buborékok válnak ki (nyilván O_2), viszont ugyanez anaerob körülmények között nem tapasztalható.

A keletkező H_2O_2 hozzávetőleges mennyiségének megállapítására különböző alkalommal végzett két kísérlet eredményét az 1. táblázat mutatja.

Látjuk, hogy a két egymásutáni napon végzett kísérletben a formazán eltűnése nem azonos idő alatt következett be (IX. 2.-án párás volt a levegő, gyengébb a napfény), a keletkezett, helyesebben a reakciós idő végén meghatározott H_2O_2 mennyisége is különböző volt. Mindkét kísérletben azonban egybeesik a H_2O_2 megjelenése a formazán ugrásszerű elszíntelenedésével. Az is megfigyelhető, hogy a H_2O_2 mennyisége a kezdeti emelkedés után a reakció vége felé csökkenést mutat; nyilván nem képződik ekkor már új H_2O_2 s a bomlás jut érvényre. Joggal feltehető, hogy ez a bomlás már a reakció elején is folyik s mértéke nem ugyanúgy változik a fényviszonyokkal, mint a formazán elszíntelenedése. Megfigyeltük több, itt nem részletezett kísérletben, hogy kedvező esetben a H_2O_2 mennyisége megközeleliti a $2 \cdot 10^{-4}$ molt, vagyis a formazán kezdeti mennyiségének kétszeresét. Ez meg egyezik azzal, ami az elszíntelenedési és a parallel lejátszódó diszproporcionálódási reakció egybevetése alapján kiszámítható.

1. táblázat

$10^{-4}M$ GF víz oldatában levegővel érintkezve különböző ideig napon való állás után meghatározott vegyületek mennyisége 10^{-4} molban kifejezve

| Kísérlet kelte | A reakció végén meghatározott anyag | Reakciós idő órákban | | | | | | |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------|---------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | | 0 | $\frac{1}{2}$ | 1 | $1\frac{1}{2}$ | 2 | $2\frac{1}{2}$ | 3 |
| IX. 1. | GF | 1,00 | 0,90 | 0,10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | GTC | 0 | 0,05 | 0,34 | 0,10 | 0,04 | 0 | 0 |
| | foto-GTC | 0 | 0,05 | 0,47 | 0,73 | 0,64 | 0,65 | 0,5 |
| | H_2O_2 | 0 | 0,16 | 0,60 | 0,70 | 1,00 | 0,90 | 0,70 |
| IX. 2. | GF | 1,00 | 1,00 | 0,90 | 0,53 | 0 | 0 | 0 |
| | GTC | 0 | 0 | 0,05 | 0,20 | 0,20 | 0,04 | 0 |
| | foto-GTC | 0 | 0 | 0,03 | 0,18 | 0,64 | 0,65 | 0,58 |
| | H_2O_2 | 0 | 0,1 | 0,12 | 0,40 | 1,40 | 1,30 | 1,09 |

10. Említettük, hogy a formazánok nitrogén-térben is elszíntelenednek, H_2O_2 képződése nélkül. Ez arra mutat, hogy a hiányzó O_2 hidrogén-akceptor szerepét ez esetben más anyag tölti be. Hogy ennek a reakciónak lefolyásáról

némi képet alkossunk, az 1. táblázatban közölt, IX. 1-i kísérlettel párhuzamosan és azonos körülmények között, annak egy anaerob változatát* is elvégeztük. Fotometrálassal, ill. polarográfiásan megállapítottuk az oldat összetételét különböző ideig tartó megvilágítás után. A kapott eredményeket a 2. táblázat foglalja össze.

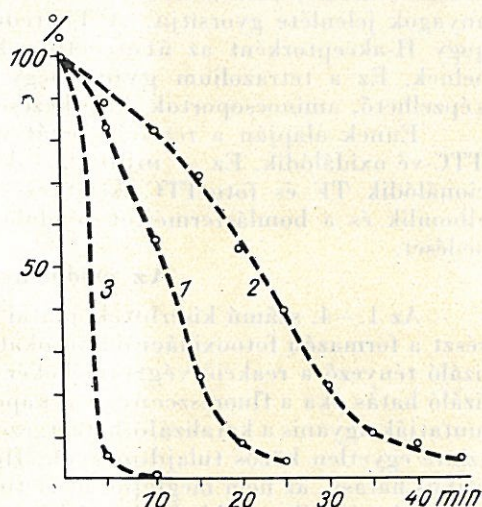
2. táblázat

10^{-4} M GF víz oldatában N_2 -térben különböző ideig napon való állás után meghatározott vegyületek mennyisége 10^{-4} molban kifejezve

| A reakció végén meghatározott anyag | Reakciós idő órákban | | | | | | |
|-------------------------------------|----------------------|---------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | 0 | $\frac{1}{2}$ | 1 | $1\frac{1}{2}$ | 2 | $2\frac{1}{2}$ | 3 |
| GF | 1,00 | 0,82 | 0,30 | 0,15 | 0,12 | 0,10 | 0 |
| GTC | 0 | 0,05 | 0,22 | 0,18 | 0,13 | 0,13 | 0,12 |
| foto-GTC | 0 | 0,05 | 0,22 | 0,20 | 0,13 | 0,11 | 0,10 |
| H_2O_2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

A táblázat adatát összevetve az 1. táblázat megfelelő adataival, megállapítható, hogy míg az előbbinél 3 órás reakció után a GF eredeti mennyiségének felét megtaláltuk GTC, ill. foto-GTC alakjában, addig az anaerob reakciónál csak 20%-át. A reakció során a GF egy része tehát olyan anyaggá alakult, mely polarográfiás lépcsőt nem ad. Ez a „hiány” aerob viszonyok között, mérsékelt megvilágításnál kicsi szokott lenni, úgyhogy eddigi kísérleteinkben nem okozott zavart. Mindebből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy N_2 -térben a formazán fotooxidációja vagy egy másik molekula formazán rovasára (diszproporcionálódás) vagy pedig a keletkező termékek egyikének rovasára történik. Minthogy az oldatban egyidejűleg 3 vegyület van egymás mellett, ezek igen sokféle reakciója képzelhető el. Ezek közül egyik legvalószínűbb kombináció a formazánnak diszproporcionálódása benzhidrazidinná vagy más redukciós terméké és TTC-vé, ill. GTC-vé. A keletkező TTC (ill. GTC) szintén diszproporcionálódik foto-TTC és formazán keletkezése mellett. A foto-TTC pedig fény hatására magától is elbomlik, redukáló anyag jelenlétében méginkább. Ez a bomlástermék polarográfiás lépcsőt nem ad, közelebbi természetének megállapítására vizsgálatunk nem terjedt ki.

11. A kísérletek során észrevettük, hogy a formazánok erősen lúgos közegben sötétben is elszíntelenednek. Bár jelen munkánk célja a formazánok fény-



10. ábra

70%-os alkoholban oldott 10^{-4} M TF elszíntelenedése levegőn, sötétben. 1: n KOH. 2: n/2 KOH. 3: n/2 KOH és 10^{-4} M foto-TTC jelenlétében

* A levegő elűzésére használt N_2 kb. 0,5% O_2 -t tartalmazott, tehát a reakció nem teljesen anaerob. A kezirat lezárása után O_2 -mentes H_2 -el végezve a levegő eltávolítását, a formazán sokkal lassabban színtelenedett el.

hatásra való oxidációjának ismertetése, mégis célszerűnek látszik fenti reakcióval kapcsolatos kísérleti eredményeinket is itt közölni, mert ezáltal a jelenségek összefüggéseibe mélyebb betekintést nyerhetünk a fényen és sötétben való reakció analógiája folytán. A lúgos közeg oxidáló hatása megmagyarázza a 7. sz. kísérletben leírt ama jelenséget is, hogy a formazánok fotooxidációjának sebessége a pH emelkedésével nő.

A lúgos közegben, sötétben való elszíntelenedést a 10. ábra görbéi mutatják. Az 1. sz. görbe a reakció lefolyását normál, a 2. görbe $n/2$ KOH jelenlétében mutatja. Látjuk, hogy a reakció erősebb lúgban gyorsabb, gyengébben lassabb. Meglepő, hogy a görbe lefutása az analog fényreakcióhoz hasonlóan S alakú, vagyis szintén autokatalitikus reakcióval van dolgunk. Ez azért meglepő, mert az előbbi kísérletek szerint a fényreakciónál az autokatalízis a keletkező foto-TTC fluoreszcenciáján alapul. A 10. ábra 3. görbéje azt mutatja, hogy a sötét reakciót is katalizálja a foto-TTC. Ez viszont arra vallana, hogy mivel sötétben fluoreszcencia nincs, a katalizáló hatás a fényreakció esetében sem a fluoreszcenciának tulajdonítható. Vizsgálataink szerint azonban n KOH-ban a foto-TTC azonnal elbomlik s így az autokatalízis alapja a sötét reakciónál a foto-TTC egy vagy több bomlástermékének kémiai (oxidáló) hatása. Erre vall az is, hogy a bomlást, mint említettük, redukáló anyagok jelenléte gyorsítja. A TF redukáló anyag lévén, joggal feltehető tehát, hogy H-akceptorként az átmenetileg keletkező foto-TTC bomlástermékei szerepelnek. Ez a tetrazolium gyűrű négy nitrogén-atomját tekintve könnyen el is képzelhető, aminocsoportok keletkezése közben.

Ennek alapján a reakció tehát úgy folyik le, hogy először egy kevés TF TTC-vé oxidálódik. Ez — mint előző közleményünkben [8] láttuk — diszproporcionálódik TF és foto-TTC keletkezésével. Ez utóbbi pedig, mint mondtuk, elbomlik és a bomlástermékek oxidálónak hatva egyre fokozzák a TF elszíntelenedését.

Az eredmények megbeszélése

Az 1.—4. számú kísérletek adatai beigazolták azt a feltevésünket, hogy egyrészt a formazán fotooxidációja autokatalitikus folyamat, s másrészt hogy a katalizáló tényező a reakció végtermékeként keletkező foto-TTC, végül, hogy a katalizáló hatás oka a fluoreszcenciával kapcsolatos. Kémiaiilag egészen eltérő anyagok mutatják ugyanis a katalizáló hatást, ezeknek az anyagoknak pedig a fluoreszcencia szinte egyetlen közös tulajdonságuk. Hogy nem minden fluoreszkáló anyag katalitikus hatású, az nem meglepő, mert tudjuk, hogy az ilyen természetű katalitikus hatás létrejöttéhez több kedvező tényező találkozása szükséges; maga a fluoreszcencia ténye ennek nem elégséges feltétele, hanem a hullámhossz, stb. döntő fontosságú. E kérdéssel a szakirodalom részletesen foglalkozik.

Hauser [3] azt a tapasztalatát, hogy sósav hozzáadása gyorsítja a TF elszíntelenedését, azzal magyarázza, hogy a TF oxidációjához TTC-vé anion jelenlétére van szükség és ezt biztosítja a sósav hozzáadásával. Kísérleteink adatai ennek a magyarázatnak ellentmondani látszanak több okból is:

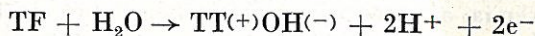
a) Ha az anion jelenléte volna a döntő tényező, akkor HCl helyett KCl-t hozzáadva ugyancsak fokozódnia kellene az elszíntelenedésnek, viszont adataink szerint az éppen ellenkezőleg erősen csökken.

b) A 7. számú kísérletünkben a közeg pH értékének beállítása azonos komponensekből összeállított univerzál pufferral történt, vagyis ugyanazon anionok mindegyik pH értéknél jelen voltak. Ilyen körülmények között a kísérlet kétségtelenné teszi, hogy a pH a döntő tényező az elszíntelenedés sebességére, nem pedig az anion jelenléte.

c) 6. számú kísérletünk szerint az oldatban a víz hiánya erősen lassítja a TF elszíntelenedését. Feltehető, hogy H a u s s e r kísérletében pl. 96 %-os alkoholhoz adott sósavat, így annak víztartalma is hozzájárult az elszíntelenedés gyorsulásához.

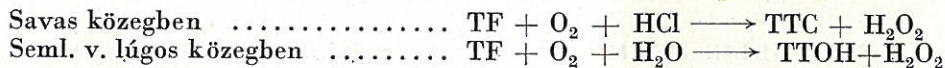
Az a körülmény, hogy a lúgos közeg is gyorsítja a formazán elszíntelenedését, azzal magyarázható, hogy ilyen feltételek mellett csökken a formazán aktiválási energiája és nő a reakciósebesség. Mint később láttuk, erősen lúgos közegben még sötétben is megtörténik a formazán spontán oxidációja. Ezek az észleletek jól megegyeznek azzal a megállapításunkkal, hogy a TTC/TF rendszer reverzibilitása a lúgossággal nő. Ezen az alapon az volna várható, hogy savas közegben még lassúbb legyen a színtelenedés, mert ott az aktiválási energia még nagyobb. A közölt adatok ellenben ennek fordítottját mutatják. Legvalószínűbb magyarázata ezen ellentmondásnak az, hogy savas közegben, mint előző egyik közleményünkben [7] kimutattuk, nem a formazán, hanem az 1. és 2. helyzetű N-atomon redukált szintelen termék a stabilabb; feltehető, hogy a formazán savas közegben ezen terméké alakul át fény hatására. De az is valószínű, hogy a fotooxidációval keletkezett TTC újra való diszproporcionálódásakor már nem formazán keletkezik, hanem az említett szintelen termék. Ez is hozzájárulhat a színtelenedés gyorsulásához.

Összevetve H a u s s e r azon megállapítását, hogy a formazán fotooxidációja sokkvantumos folyamat, a mi észleletünkkel a víz jelenlétének fontosságára nézve, felmerül annak lehetősége, hogy a formazán oxidációjához szükséges anion eredete a víz fotolízisében keresendő, ha a közeg lúgos kémhatású:



A 8. kísérletben tapasztalt azon jelenség, hogy az átalakult formazán mennyisége nem független a formazán kezdeti koncentrációjától, ellentétben áll a fotokémia azon törvényével, hogy az elnyelt fénykvantumok számával arányos az átalakult mennyiség. Mivel az utóbbi állandó megvilágítás esetén egy időtartam (pl. jelen esetben 6 óra) alatt adott érték, ezért ennek nagysága szabja meg az ezen idő alatt átalakult mennyiséget. Ha a reakciónak a fotokémia ezen alaptörvényét teljesen követné, a 8. ábra A görbéjének vízszintesnek kellene lennie, vagyis a kiindulási formazán koncentrációtól függetlennek kellene lennie az átalakult formazán mennyiségének. Hogy mégis 24 % eltérés miért észlelhető, ennek vizsgálatára nem térünk ki.

A 9. sz. kísérlet alapján a formazánok fotooxidációjának mechanizmusát, összevetve előzőleg ismertett eredményeinkkel a következőképpen képzelhetjük el:



Mivel a keletkező TTC fele a diszproporcionálódási reakció során ismét TF-á alakul, a reakció teljes lefolyása során $1 + \frac{1}{2} + \frac{1}{4} + \dots = 2 \text{ M H}_2\text{O}_2$ -nak kell keletkeznie

Formazán helyett TTC-ből kiindulva ennek fele rögtön foto-TTC-vé alakul s csak a másik fele formazanná. Így végeredményben az előbbinek csak fele mennyiségű H_2O_2 keletkezik: $\frac{1}{2} + \frac{1}{4} + \frac{1}{8} + \dots = 1 \text{ M}$. Kísérleteink ezt igazolták: GF besugárzásakor kétszerannyi H_2O_2 volt kimutatható, mint TTC-ből kiindulva.

A reakció-mechanizmus ezen magyarázata a savas közeg elszíntelenedését gyorsító hatásának újabb lehetséges okát adja: ha az aniont savas közegből

veszi a keletkező TTC úgy az feltehetően kisebb energiát igényel, mintha semleges vagy lúgos közegben a vizet előzőleg elbontani.

Végül köszönettel tartozom Paul Ilona és Kisbán Klára kartársnőknek buzgó technikai közreműködésükért.

Összefoglalás

Polarográfiai és fotometriás módszerrel tanulmányoztuk egyes formazánok fotooxidációját és a következő főbb megállapításokat tettük:

1. A TTC és galakto-származékainak formazánjai levegő jelenlétében H_2O_2 keletkezése mellett fotooxidációt szenvednek. Anaerob körülmények között is elszíntelenednek, de csak igen lassan és az oxidáló agens ez esetben a foto-TTC vagy bomlásterméke, H_2O_2 pedig nem keletkezik.

2. A formazánok aerob fotooxidációja autokatalitikus folyamat: katalizátor a végtermékként keletkező foto-TTC (ill. annak származékai). A katalízis ennek fluoreszcenciáján alapszik. Más fluoreszkáló anyagok is katalitikus hatásúaknak bizonyultak. Elektrolitok jelenléte a fluoreszcenciát és a katalizáló hatást egyaránt csökkenti.

3. Az aerob elszíntelenedés sebességét csökkenti az oldószer víztartalmának csökkentése, növeli az erősen savas és lúgos kémhatás. A molekulaszervezet is döntő hatással van: a megvizsgált vegyületek közül leggyorsabban a TF színtelenedik el, a GF 3-szorta, a GF-acetát kb. 10-szerre lassabban.

4. A fotooxidáció mértéke adott kísérleti feltételek mellett csaknem független a formazán koncentrációjától: az időegységenként átalakuló formazán azonos mennyiségű, a fotokémia alaptörvénye értelmében. Az ettől való kis eltérés okát nem vizsgáltuk.

Érkezett: 1955. március 1.

Irodalom

- [1] Atkinson, E., Melon, S. & Fox, S. W.: Science. **III.** 385. 1950.
- [2] Ellinger, P.: Biochem. J. **38.** 147. 1944.
- [3] Hausser, K. H.: Z. Naturforsch. **53.** 41. 1950.
- [4] Hausser, I., Jerchel, D. & Kuhn, R.: Ber. **82.** 195. 1949.
- [5] Heyrovsky, J.: Polarographisches Praktikum. Springer. Berlin. 1948.
- [6] Hiatt, H. H. & Shorr, E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **8.** 543. 1953.
- [7] Jámbo, B.: Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **4.** 55. 1954.
- [8] Jámbo, B.: Agrokémia és Talajtan. **5.** 89. 1956.
- [9] Plotnikow, J.: Allgemeine Photochemie Berlin. 2. kiadás. 1934.
- [10] Vitek, V.: Coll. Czechoslov. Chem. Comm. **7.** 537. 1935.

СВЕТОВЫЕ РЕАКЦИИ ТЕТРАЗОЛИЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ II. ФОТООКИСЛЕНИЕ ФОРМАЗАНОВ

Б. Ямбор

Кафедра физиологии растений Университета им. Л. Этвеша, Будапешт (Венгрия)

Резюме

При помощи полярографических и фотометрических методов мы изучали фотоокисление некоторых формазанов и пришли к следующим основным заключениям:

1. ТТХ и формазаны его галакто-производных в присутствии воздуха перетерпевают фотоокисление с образованием H_2O_2 . Эти соединения обесцвечиваются и при анаэробных условиях, но очень медленно, при чем в этом случае окисляющим агентом является фото-TTX или продукты его разложения, но H_2O_2 не образуется.

2. Аэробное фотоокисление формазанов представляет собой втокаталитический процесс: катализатором является образующийся в качестве конечного продукта фото-ТТХ (или его производные). Катализация основывается на флюоресценции последнего. Прочие флюоресцирующие вещества оказывают тоже каталитическое действие. Присутствие электролитов снижает как флюоресценцию, так и катализирующее действие.

3. Скорость аэробного фотоокисления падает по мере уменьшения содержания воды растворителя, и возрастает при сильно кислотной или щелочной реакции среды. Строение молекулы оказывает также решающее влияние: из исследуемых соединений быстрее всех обесцвечивается ТФ, 3 раза медленней ГФ, а ацетат ГФ примерно 10 раз медленнее.

4. Степень фотоокисления при данных экспериментальных условиях почти не зависит от концентрации формазана: количество превращающегося в единицу времени формазана — согласно основному закону фотохимии — одинаковое. Небольшое отклонение от этого мы объясняем диффузией кислорода, участвующего в реакции.

Рисунок 1.: Количество реакционных продуктов, найденных в 10^{-4} М водном растворе ГФ в присутствии воздуха, после стояния в течение различного времени на рассеянном солнечном свете (в %-ах от исходного количества ГФ).

Рисунок 2.: Реакция 10^{-4} М ГФ при аналогичных рисунку 1. экспериментальных условиях, но в присутствии 10^{-5} М фото-ТТХ.

Рисунок 3.: Обесцвечивание 10^{-4} М водного раствора ГФ в присутствии 10^{-5} М витамина B_2 (I), фото-ТТХ (II) и без него (III) на рассеянном солнечном свете, в присутствии воздуха.

Рисунок 4.: Обесцвечивание 10^{-4} М ТФ на прямом солнечном свете в присутствии воздуха, в 70%-ом спиртовом растворе при действии различных флюоресцирующих веществ концентрации 10^{-5} М. 1: без добавления флюоресцирующего вещества; 2—3: флюоресцин, фото-ТТХ; 4—5: витамин B_2 , родамин Б; 6—7: берберинсульфат, аурамин; 8: вместо флюоресцирующего вещества добавлен раствор ТФ, содержащий примерно 5 мг/мл KCl.

Рисунок 5.: Время полу-обесцвечивания 10^{-4} М ТФ, ГФ и ацетата ГФ, в зависимости от содержания спирта в растворе, на солнечном свете в присутствии воздуха.

Рисунок 6.: Обесцвечивание 10^{-4} М трифенилформазана в присутствии воздуха на солнечном свете, в 70%-ом спирте, рН которого устанавливалась при помощи буфера на различную величину.

Рисунок 7.: Время полу-обесцвечивания 10^{-4} М ТФ в зависимости от величины рН раствора.

Рисунок 8.: Количество ГФ, превратившегося в водном растворе ГФ различной концентрации после 6-ти часового стояния на рассеянном солнечном свете. А: в абсолютных величинах; В: в %-ах от начальной концентрации ГФ.

Рисунок 9.: Образование перекиси водорода. Полярограммы слева направо: 10^{-2} М KCl, снята в присутствии воздуха (вторая ступень соответствует примерно $2,5 \cdot 10^{-4}$ М H_2O_2); 2: 10^{-4} МГФ после стояния на свету в течение 2 часов; 3: 10^{-4} М ГТХ после стояния на свету в течение 2 часов; 4: 10^{-4} М ГФ после стояния на свету в течение 1 часа. Первая ступень является ступенью ГФ + ГТХ, вторая — фото-ГТХ, а третья — H_2O_2 ; 5: То-же после добавления одной капли крови.

Рисунок 10.: Обесцвечивание 10^{-4} М ТФ, растворенного в 70%-ом спирте, на воздухе и в темноте. 1: в присутствии $n \cdot KOH$; 2: $n/2 KOH$; 3: $n/2 KOH$ и 10^{-4} М фото-ТТХ.

Die Lichtreaktionen der Tetrazoliumverbindungen

II. Fotooxydation der Formazane

B. JÁMBOR

Pflanzenphysiologisches Institut der L. Eötvös Universität, Budapest (Ungarn)

Zusammenfassung

Mit polarographischer und photometrischer Methode haben wir die Photooxydation einzelner Formazane studiert und die folgenden wichtigsten Feststellungen gemacht:

1. Die Formazane der TTC und Galakto-Derivate erleiden bei Gegenwart von Luft unter Entstehung von H_2O_2 -Photooxydation. Auch unter anaeroben Verhältnissen verlieren sie die Farbe, jedoch nur sehr langsam und der oxydierende Agent ist in diesem Falle das Photo-TTC oder dessen Zersetzungsprodukt: H_2O_2 hingegen entsteht nicht.

2. Die aerobe Fotooxydation der Formazane ist ein autokatalytischer Prozess: Katalysator ist der als Endprodukt entstehende Photo-TTC (bzw. dessen Derivate). Die Katalyse beruht auf dessen Fluoreszenz. Andere fluoreszierende Substanzen haben auch katalytische Wirkung aufgewiesen. Das Vorhandensein von Elektrolyten verringert sowohl die Fluoreszenz als auch die katalysierende Wirkung.

3. Die Geschwindigkeit der aeroben Entfärbung des Formazans wird durch die Verringerung des Wassergehaltes des Lösungsmittels verringert, — durch die stark saure und alkalische Reaktion erhöht. Auch die Molekülstruktur ist von entscheidender Einwirkung: von den geprüften Verbindungen entfärbt sich am raschesten die TF, die GF ungefähr 3-mal und das GF-Acetat ca. 10-mal so langsam.

Das Mass der Photooxydation ist unter den gegebenen Versuchsbedingungen beinahe unabhängig von der Konzentration des Formazans: die in der Zeiteinheit umgewandelte Formazanmenge ist gleich, im Sinne des Grundgesetzes der Photochemie.

Abb. 1.: In der wässrigen Lösung von 10^{-4} M GF, bei Vorhandensein von Luft, nach an diffusen Sonnenlicht kürzere oder längere Zeit hindurch erfolgtes Stehen gefundene Mengen der Reaktionsprodukte, als % der ursprünglichen Menge.

Abb. 2.: Reaktion des 10^{-4} M GF, unter gleichen Versuchs-Bedingungen mit Abbildung 1, jedoch in Gegenwart von 10^{-5} M Photo-TTC.

Abb. 3.: Die Entfärbung der wässrigen Lösung von 10^{-4} M GF bei Vorhandensein von 10^{-5} M B₂-Vitamin (I) Photo-TTC (II) und ohne diese (III) an diffusen Sonnenlicht, bei Gegenwart von Luft.

Abb. 4.: Die Entfärbung von 10^{-4} M TF an direktem Sonnenlicht, in Gegenwart von Luft in einer Lösung von 70%-igem Alkohol, auf Einwirkung von verschiedenen fluoreszierenden Substanzen in 10^{-5} M Konzentration. 1: Ohne Beigabe von fluoreszierender Substanz. 2–3: Fluorescein, Photo TTC. 4–5: B₂-Vitamin, Rhodamin B. 6–7: Berberinsulfat, Auramin. 8: Anstatt fluoreszierender Substanz ca. 5 mg/ml KCl.

Abb. 5.: Die Halbierungszeit der Entfärbung des 10^{-4} M TF, GF und GF-Acetat, als Funktion des Alkoholgehaltes der Lösung, an der Sonne, bei Vorhandensein von Luft.

Abb. 6.: Entfärbung von 10^{-4} M Triphenylformazan an der Sonne, in mit Puffer auf verschiedene pH-Werte eingestellten 70%-igen Alkohol, in Gegenwart von Luft.

Abb. 7.: Die Halbierungszeit der Entfärbung von 10^{-4} M TF, als Funktion des pH-Wertes der Lösung.

Abb. 8.: Die in wässriger GF-Lösung verschiedener Konzentration, auf die Einwirkung von 6-stündigem diffusen Sonnenlicht sich umgewandelte Menge von GF. A: In absolutem Werte. B: In % der anfänglichen GF Konzentration.

Abb. 9.: Die Entstehung von Hydrogenperoxyd. Die Polarogramme von links nach rechts: 1: 10^{-2} M KCl, bei Vorhandensein von Luft aufgenommen (die zweite Stufe entspricht ca. $2,5 \cdot 10^{-4}$ M H₂O₂). 2: 10^{-4} M GF, nachdem es 2 Stunden hindurch im Licht gestanden hat. 3: 10^{-4} M GTC, nachdem es 2 Stunden hindurch an dem Licht gestanden hat. 4: 10^{-4} M GF, nachdem es eine Stunde an dem Licht gestanden hat: die erste Stufe ist GF+GTC, die zweite das Photo-GTC, die dritte Stufe entspricht dem H₂O₂. 5. Dasselbe, nach Hinzugabe von einem Tropfen Blut aufgenommen.

Abb. 10.: Entfärbung von in 70%-igem Alkohol gelöstem 10^{-4} M TF an der Luft, im Finstern. 1: Bei Vorhandensein von n KOH. 2: Bei Vorhandensein von n/2 KOH. 3: Bei Vorhandensein von n/2 KOH und 10^{-4} M Photo-TTC.